

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. Juni 2001 (21.06.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/43772 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 39/39

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/04608

(22) Internationales Anmeldedatum:
18. Dezember 2000 (18.12.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 60 705.2 16. Dezember 1999 (16.12.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): LASER- UND MEDIZIN TECHNOLOGIE GGMBH BERLIN [DE/DE]; Fabbeckstrasse 60-62, 14195 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER, Gerhard [DE/DE]; An der Rehwiese 8, 14129 Berlin (DE). KRA-SICKA-ROHDE, Ewa [DE/DE]; Badensche Strasse 8, 10825 Berlin (DE). BINDIG, Uwe [DE/DE]; Berliner

Strasse 155/IV, 10825 Berlin (DE). BEUTHAN, Jürgen [DE/DE]; Calandrellistrasse 15, 12247 Berlin (DE). DRESSLER, Cathrin [DE/DE]; Windscheidstrasse 22, 10627 Berlin (DE). MINET, Olaf [DE/DE]; Ufnaustrasse 3, 10553 Berlin (DE). PHILIPP, Carsten [DE/DE]; Wedellstrasse 11, 12247 Berlin (DE). BERLIEN, Hans-Peter [DE/DE]; Warmbrunner Strasse 23a, 14193 Berlin (DE).

(74) Anwalt: EISENFÜHR, SPEISER & PARTNER; Pacelliallee 43/45, 14195 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR PRODUCING AN AUTOLOGOUS IMMUNIZATION VACCINE AGAINST CANCEROUS DISEASES (TUMOUR VACCINE)

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR HERSTELLUNG EINES AUTOLOGEN IMMUNISIERUNGS-IMPfstoffes GEGEN KREBSERKRANKUNGEN (TUMORVAKZINE)

(57) Abstract: The invention relates to a method and device enabling vital tumour cells taken from the bodies of humans or animals to be modified in such a way that they can be re-introduced into the living organism in an inactivated state, stimulating the immune system of said organism, by means of a polyvaccine.

(57) Zusammenfassung: Es soll ein Verfahren und eine Vorrichtung entwickelt werden, mittels derer es gelingt vitale, aus dem Körper des Menschen oder des Tieres gewonnene Tumorzellen derart zu modifizieren, dass sie, inaktiviert, jedoch das Immunsystem des Lebewesens stimulierend, im Rahmen einer einfachen oder Mehrfach-Impfung dem lebenden Organismus wieder zugeführt werden können.

WO 01/43772 A2

Verfahren und Vorrichtung zur Herstellung eines autologen Immunisierungsimpfstoffes gegen Krebserkrankungen (Tumorvakzine)

Gegenstand der Erfindung sind ein Verfahren zur Herstellung eines immunstimulierenden Präparates, photodynamische Verbindungen sowie die Verwendung dieser Verbindungen.

Um maligne Erkrankungen, insbesondere Krebs verschiedener Genese zu behandeln, wurde schon vorgeschlagen, Impfstoffe gegen Krebszellen einzusetzen. Die hier erzielten Erfolge waren bisher jedoch noch nicht überzeugend.

Stand der Technik

Die extrakorporale Photopherese wird zur Immunmodulation bei Erkrankungen des Weißzellensystems (Autoimmunerkrankungen und cutaner T-Zell-Lymphom (CTCL)) mit Erfolg eingesetzt. Bei der extrakorporalen Photopherese handelt sich um eine Art der Phototherapie, bei der durch das Zentrifugieren des dem Patienten entnommenen Blutes leukozytenangereicherte Plasmafraktion entsteht, welche nach der Zugabe des photoaktiven Psoralens (Fumarinderivat) mit UVA-Licht (320 - 400 nm) bestrahlt, und anschließend dem Patientenkreislauf wieder zugeführt wird. Das Prinzip der Behandlung basiert darauf, dass sich das unter normalen Bedingungen inerte Psoralen nach Absorption von Photonen an die Basen der Doppelstrang-DNA kovalent bindet und somit die DNA-Replikation verhindert, was zur Schädigung und Zerstörung der Zellen (Apoptose) führt. Nach Zuführung dieser Zellen in den Blutkreislauf des Patienten sterben diese Zellen innerhalb von ca. zwei Wochen, was zu einer autologen Immunantwort des Organismus, die sich gegen die Zellen dieser Art richtet, führt. Da bei Autoimmunerkrankungen bzw. bei dem CCTL vor allem die Zellen eines Klonen überdurchschnittlich zahlreich im Blut auftreten, richtet sich die massive Immunantwort vor allem gegen diese Zellen. Ein entsprechendes Photophoresesystem wird beispielsweise unter dem Handelsnamen UVAR XTS System durch die Firma Therakos vertrieben. Derartige Photophoresesysteme sind jedoch ausschließlich zur Behandlung von entarteten Leukozytenfraktionen geeignet.

Aufgabenstellung

Aufgabe der Erfindung war es, ein Verfahren zur Herstellung eines immunstimulierenden Präparates bereitzustellen, mit dem verschiedene Arten von malignen Erkrankungen behandelt werden können. Außerdem war es Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem ein Präparat für jeden Patienten maßgeschneidert hergestellt werden kann. Eine weitere Aufgabe der Erfindung war es, Verbindungen bereitzustellen, mit denen derartige immunstimulierende Präparate

behandelt werden können und die Verwendung von derartigen Verbindungen zur Behandlung von malignen Zuständen, insbesondere Krebs.

Es soll ein Verfahren und eine Vorrichtung entwickelt werden, mittels derer es gelingt, vitale, aus dem Körper des Menschen oder des Tieres gewonnene Tumorzellen derart zu modifizieren, dass sie, inaktiviert, jedoch das Immunsystem des Lebewesens stimulierend, im Rahmen einer einfachen oder Mehrfach-Impfung dem lebenden Organismus wieder zugeführt werden können.

Erfindungsgemäße Lösung

Die genannten Aufgaben werden gelöst mit den in den Ansprüchen angegebenen Verfahren, Verbindungen und Verwendungen.

Gemäß einem ersten Aspekt wird ein Verfahren zur Herstellung eines immunstimulierenden Präparates bereitgestellt, bei dem man maligne Zellen mit einer photodynamischen Verbindung, die durch Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge im Spektralbereich von 300 nm bis 3 μ m aktiviert werden kann, versetzt und anschließend die erhaltene Mischung mit Licht einer Wellenlänge im Spektralbereich zwischen 300 nm und 3 μ m bestrahlt.

Überraschenderweise wurde festgestellt, dass es mit dem erfindungsgemäßen Verfahren möglich ist, dem Patienten vorher entnommene Tumorzellen ex vivo so zu behandeln, dass sie ihre Tumorigenität verlieren, ihre immunstimulierenden Eigenschaften aber behalten. Mit den erfindungsgemäß hergestellten Präparaten ist es daher möglich, Immunreaktionen auszulösen, die gegen die Tumorzellen gerichtet sind, ohne dem Körper durch Injektion von sich vermehrenden Tumorzellen Schaden zuzufügen. Dies wird erreicht, indem die Zellen so behandelt werden, dass sie nach einer vorbestimmten Zeit absterben.

Hierzu werden erfindungsgemäß photodynamische Verbindungen verwendet, die durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge aktivierbar sind. "Aktivierung" bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die photodynamische Verbindung, wenn sie mit Licht in der entsprechenden Wellenlänge bestrahlt wird, in der Umgebung vorhandenen Sauerstoff in Singulett-Sauerstoff umwandeln kann, der dann sehr reaktiv ist und die Umgebung angreift. Bei der vorliegenden Erfindung wird die photodynamische Verbindung mit malignen Zellen in Kontakt gebracht und dann mit Licht der richtigen Wellenlänge bestrahlt. Dadurch kommt es zu einer gezielten Schädigung der malignen Zellen in solcher Weise, dass diese nach vorbestimmter Zeit absterben, d.h. die Apoptose eintritt.

Um diese Wirkung zu erzielen, muss die erfindungsgemäß eingesetzte photodynamische Verbindung zwei Eigenschaften erfüllen:

- 1) sie muss durch Licht einer Wellenlänge im beanspruchten Bereich aktivierbar sein und
- 2) sie muss so aufgebaut sein, dass sie an Zellstrukturen, wie Zellmembran, Zellkernmembran, Mitochondrienmembran anhaftet oder bindet.

Bevorzugt weist die photodynamische Verbindung dazu lipophile Bereiche auf. Als geeignet haben sich Verbindungen aus der Gruppe Porphyrine, Phthalocyanine, Chlorine, Hämatoporphyrin, Benzoporphyrin, Aminolävulinsäure sowie deren Derivate erwiesen. Diese Verbindungen, die überwiegend makrocyclische Gerüste aufweisen, sind ausreichend lipophil, so dass sie von den Zellen aufgenommen und angereichert werden können.

Als Derivate der genannten Verbindungen kommen insbesondere solche in Betracht, die Substituenten aufweisen, die für eine verbesserte Bindung an Zellmembranen oder andere Zellstrukturen geeignet sind. Bevorzugt werden Derivate verwendet, die funktionelle Gruppen aufweisen, die mit Zellmembranen bindefähig sind oder zu diesen eine Affinität haben. Inbetracht kommen beispielsweise lipophile Gruppen.

Besonders bevorzugt werden als photodynamische Verbindungen Aminolävulin-säure, Hämatoporphyrinderivate (HpD, DHE), Benzoporphyrinderivate (BpD), Photo-Chlorin (ATX-S10) oder Phthalocyaninderivate verwendet.

Es hat sich nun überraschenderweise gezeigt, dass bestimmte photoaktive Substanzen wie beispielsweise 5-ALA (Aminolävulinsäure), Hämatoporphyrinderivate (HpD, DHE), Benzoporphyrinderivate (BpD), Photo-Chlorin (ATX-S10) oder auch Phthalocyaninderivate in der Lage sind, sich sowohl extra- wie auch intrazellulär an sensible Zellstrukturen, wie Zellmembran, Zellkernmembran, Mitochondrienmembran anzulagern und nach Bestrahlung mit geeigneten Lichtwellenlängen Spektralbereich von 300 nm bis 3 μ m selektiv die Zellstrukturen, an denen sie sich vorzugsweise angelagert haben, nachhaltig zu schädigen, so dass nach einer durch die verabreichte Dosis vorher bestimmbaren Zeit eine Apoptose (Zelltod) eintritt.

Es hat sich nun weiterhin überraschenderweise gezeigt, dass in der präapoptotischen Phase derartige behandelte Zellen kein tumorigenes Potential mehr haben, andererseits jedoch über Verabreichung einer erhöhten Konzentration derartiger Zellen das Immunsystem des Organismus aktiviert wird und nunmehr derartige Zellen sowohl die präapoptotischen - später apoptotischen - Zellen zerstört wie auch noch die weiterhin im Blut bzw. in Körperflüssigkeiten vorhandenen aktiven, morphogenetisch identischen Tumorzellen eliminiert.

Um das erfindungsgemäße immunstimulierende Präparat herzustellen, werden maligne Zellen aus einem Patienten gewonnen. Hierzu können je nach Art der malignen Entartung Zellen aus Körperflüssigkeiten isoliert werden oder, bei Vorliegen von soliden Tumoren, Gewebeproben entnommen werden. Um die malignen Zellen aus Körperflüssigkeiten zu isolieren, können an sich bekannte Vorrichtungen eingesetzt werden. Geeignet ist z.B. ein Zellsorter.

In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel werden den nach medizinischer Fragestellung in Betracht kommenden Körperflüssigkeiten (Blut, Lymphe, etc.) durch einen Zellsorter nach dem Stand der Technik Tumorzellen entnommen. Die angereicherte Suspension der Tumorzellen wird sodann mit einer vorher bestimmten Dosis eines bevorzugten photochemischen Reaktanden, z. B. 5-Aminolävulinsäure oder Photo-Chlorin, versetzt und mit einer Wellenlänge bestrahlt, die eine möglichst hohe Apoptoserate erzielt. In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel der 5-Aminolävulinsäure ist dies die Wellenlänge von ca. 510 bis 540 nm, die beispielsweise durch einen Argon-Ionen-Laser oder einem frequenzvervielfachten Neodym-YAG-Laser erzeugt werden kann.

Die derartig bestrahlte Zellsuspension wird sodann dem erkrankten Organismus wieder zugeführt, um eine Autoimmunreaktion zu provozieren.

Erfindungsgemäß ist jedoch auch die Entnahme einer Zell-Probe aus dem soliden Tumor anstelle der Anwendung von körperflüssigkeitsgängigen Einzelzellen.

Zur Herstellung des erfindungsgemäßen immunstimulierenden Präparates werden maligne Zellen mit einer solchen Menge an photodynamischer Verbindung behandelt, dass sie innerhalb eines vorbestimmten Zeitraumes absterben. Die noch lebensfähig entnommenen Zellen sollten nach der Behandlung nicht mehr als maximal 5 Tage überleben, bevorzugt sollte die Apoptose in kürzerer Zeit, z.B. innerhalb von bis zu 3 Tagen oder weniger auftreten. In einzelnen Fällen können jedoch auch längere Zeiträume inbetracht kommen, abhängig von der Art der Erkrankung.

Es war daher eine weitere Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, um eine Beziehung zwischen der Dosis der Verbindung und dem zeitlichen Auftreten der Apoptose zu bestimmen und eine quantitative Bestimmung zu ermöglichen.

Erfindungsgemäß wird hierzu eine Methode bereitgestellt, die durch Bestimmung des aktiven Zellstoffwechsels den Erfolg der erfindungsgemäßen Behandlung überprüft. Hierzu werden solche Zellen, wie sie dann auch zur Behandlung vorgesehen sind, mit der für die Behandlung eingesetzten Verbindung in vorbestimmter Dosis behandelt und mit Licht der geeigneten Wellenlänge bestrahlt. Danach wird über einen Zeitraum quantitativ die Entstehung von Coenzym NADH bestimmt. Dies erfolgt bevorzugt mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzmesstechnik. Durch Analyse des Zeitverlaufs der NADH-Konzentration kann dann festgestellt werden, welcher Anteil des sich bildenden NADH's den Mitochondrien zuzurechnen ist und welcher dem übrigen Zellraum zuzurechnen ist. Im nativen Zustand ist die Konzentration an NADH in den Mitochondrien größer, fällt aber durch selektive Einwirkung der photoaktiven Substanzen zeitlich schneller ab. Durch diese quantitative Bestimmung bietet sich daher ein Mittel, um die Überlebensdauer der erfindungsgemäß behandelten Zellen in einem Zeitrahmen einstellen zu können und die Wirkung des Präparates genauer einstellen zu können. Der Zeitverlauf der Apoptose hängt ab von Art und Menge der eingesetzten photodynamischen Verbindung und Art und Länge der Bestrahlung. Diese Parameter können unter Anwendung der gerade beschriebenen Methode so eingestellt werden, dass sie für den jeweiligen Fall optimal sind. Bevorzugt erfolgt die Untersuchung der NADH-Bildung in einem Zeitraum von 1 bis 100 Sekunden. Aus den erhaltenen Werten für die Abnahme der NADH-Konzentration wird dann auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen geschlossen und aufgrund dieser Daten können dann die für den jeweiligen Fall geeigneten Mittel und Konzentrationen ausgewählt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird nach Auswahl der jeweils geeigneten Verbindung und der Bedingungen anhand von Stichproben durch Anzüchten von Zellen überprüft, ob die Apoptose wie gewünscht eintritt.

In Weiterführung des Erfindungsgedankens wird der Erfolg der photochemisch induzierten Apoptose durch die Bestimmung des aktiven Zellstoffwechsels überprüft. Erfindungsgemäß geschieht dies durch die quantitative Bestimmung des Koenzyms -

NADH mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzmesstechnik. Nach erfolgter photochemischer Behandlung der Einzelzellen wird ja durch die intrazelluläre Schädigung, die anschließend zur Apoptose führt, der Zellmetabolismus derart geschädigt, dass durch eine quantitative Bestimmung des zeitlichen Umsatzes von NADH durch Analyse des Zeitverlaufs der NADH-Konzentration erfindungsgemäß zwischen der NADH-Konzentration in den Mitochondrien und im übrigen Zellraum unterschieden werden kann. Diese Konzentration ist im nativen Zustand in den Mitochondrien größer, wird aber hier durch die selektive Wirkung der photoaktiven Substanzen zeitlich schneller abfallen.

Erfindungsgemäß wird dieser Prozess durch folgendes mathematisches Modell beschrieben:

$$\text{NADH}(t) = A e^{-at} + B e^{-bt} + C.$$

Hierbei setzt sich der zeitliche Verlauf der NADH-Konzentration $\text{NADH}(t)$ aus dem mitochondrialen Anteil $A e^{-at}$, dem restlichen NADH-Anteil in der Zelle $B e^{-bt}$ und einem relativ kleinen, zeitunabhängigen Offset C zusammen. Die 5 Parameter A , a , B , b und C werden während der Applikation praktisch instantan mittels bekannter Methoden der numerischen Optimierung bestimmt. Mit diesen Parametern kann damit ebenfalls instantan der zeitliche Verlauf der beiden NADH-Anteile separiert und bewertet werden.

In Abbildung 1 sind auf der x-Achse 2 die Zeit und auf der y-Achse 1 die Konzentration des NADH aufgetragen. Der zeitaufgelöste Verlauf der Gesamtkonzentration des NADH 3 setzt sich additiv aus zwei Anteilen zusammen, die sich hauptsächlich durch stark unterschiedliche Abklingzeiten unterscheiden. Dabei handelt es sich um den mitochondrialen Anteil 4 und den Restanteil des NADH in der Zelle 5. Zum Zeitpunkt T 6 ist der mitochondriale Anteil des NADH 4 bereits soweit abgefallen, dass die Zelle irreversibel geschädigt wurde. Dieser Prozess kann in der Gesamtkonzentration 3 nicht erkannt und damit auch nicht beurteilt werden. Wird allerdings

der zeitliche Verlauf der NADH-Konzentration in der beschriebenen Weise instantan nach seinen beiden Hauptkomponenten 4 und 5 aufgespalten, so kann aus der separaten Beurteilung dieser Komponenten eine Verfahrenskontrolle abgeleitet werden.

Abbildung 2 verdeutlicht nochmals den erfindungsgemäßen Prozess zur biotechnischen Herstellung einer Tumor-Vakzine. Die durch Entnahme aus Körperflüssigkeiten oder Gewebe gewonnene Zellsuspension 1 wird in einer Zellkultur 2 angezüchtet und dadurch vervielfacht. Anschließend werden die Zellen dieser Zellkultur in einem Reaktionsgefäß 4 mit einem Photosensibilisator 3 versetzt und daran anschließend in einem weiteren Reaktionsgefäß 6 einer erfindungsgemäßen Laserbestrahlung 5 zur Induzierung einer photodynamischen Reaktion ausgesetzt. Anschließend befindet sich die so vorbehandelte Zellsuspension 7 in Apoptose. Zur Qualitätsicherung wird in einem weiteren Reaktionsgefäß 8 der NADH-Nachweis wie in Abbildung 1 erläutert durchgeführt. Anschließend werden durch einen Zellsorter nicht in Apoptose befindliche Zellen 9 aussortiert und durch eine sterile Rückführung 10 in den Behandlungsreaktor 4 zurückgeführt. Die nach dem Test im Reaktionsgefäß 8 in Apoptose befindlichen Zellen werden dann in einem Auffangbehälter 11 als Tumor-Vakzine gewonnen. Neben dem bevorzugten Ausführungsbeispiel ist jedoch auch jede weitere photochemische Substanz, die selektiv in Tumorzellen angereichert werden kann, mit nachfolgender Apoptose durch Bestrahlung im Spektralbereich zwischen 300 nm und 3 μ m erfindungsgemäß.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind photodynamische Verbindungen, die in einem Spektralbereich von 300 nm bis 3 μ m aktivierbar sind zur Behandlung von malignen Zellen ex vivo, um deren Apoptose zu induzieren.

Es ist bekannt, photodynamische Verbindungen zu verwenden, um gezielt Oxidationen durchzuführen unter Verwendung der bei Bestrahlung mit Licht entstehenden Sauerstoffradikale. Es wurde nun aber erfindungsgemäß festgestellt,

dass es mit Hilfe von photodynamischen Verbindungen, die bei einer Wellenlänge von 300 nm bis 3 μ m aktiviert werden können, möglich ist, ex vivo Zellen zu behandeln, so dass diese zwar die Behandlung überleben, aber nach vorbestimmter Zeit absterben. Derartig behandelte Zellen sind besonders gut geeignet, immunstimulierend zu wirken und dadurch die Behandlung der malignen Erkrankung zu fördern. Die beiden wichtigen Merkmale der photodynamischen Verbindung sind, dass sie in dem angegebenen Spektralbereich aktiviert wird, so dass Licht dieser Wellenlänge verwendet werden kann, um die Photoreaktion in Gang zu setzen, und dass die Verbindung geeignet ist, sich an Zellstrukturen anzulagern oder an diese zu binden und angereichert zu werden. Alle Verbindungen, die diese beiden Eigenschaften erfüllen, sind für die Erzeugung von Zellen mit vorbestimmter Apoptose geeignet. Die hierzu besonders geeigneten Verbindungen sind oben genauer dargestellt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von photodynamischen Verbindungen, wie sie eben definiert wurden, zur Herstellung eines immunstimulierenden Präparates zur Behandlung von malignen Zuständen, insbesondere von Krebs.

Das erfindungsgemäß hergestellte immunstimulierende Präparat kann in an sich bekannter Weise dem Patienten verabreicht werden, um seine immunstimulierende Wirkung auszuüben. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das erhaltene Präparat dem Patienten einmal oder mehrmals, bevorzugt in einem geeigneten Träger, injiziert. Auch andere Verabreichungsmöglichkeiten, wie orale Gaben, sind möglich und können mit Routineverfahren, wie sie dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt sind, durchgeführt werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines immunstimulierenden Präparates, bei dem man maligne Zellen mit einer photodynamischen Verbindung, die durch Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge im Spektralbereich von 300 nm bis 300 μm aktivierbar ist, versetzt und anschließend die erhaltene Mischung mit Licht einer Wellenlänge im Spektralbereich zwischen 300 nm und 3 μm bestrahlt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als maligne Zellen lebensfähige Tumorzellen aus soliden Tumoren oder Körperflüssigkeiten gewonnen werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als photodynamische Verbindung eine Verbindung eingesetzt wird, die ausgewählt ist aus Porphyrinen, Phthalocyaninen, Hämatoporphyrin, Benzoporphyrin, Chlorinen, Aminolävulinsäure und Derivaten der vorgenannten Verbindungen.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Derivate solche Verbindungen verwendet werden, die Substituenten aufweisen, die an Zellwände oder Zellstrukturen binden oder haften.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als photodynamische Verbindung Aminolävulinsäure, Hämatoporphyrin, Benzoporphyrin oder Photo-Chlorin verwendet wird.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die malignen Zellen aus Körperflüssigkeiten durch einen Zellsorter isoliert werden.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die malignen Zellen durch Gewebebiopsie gewonnen werden.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Bestrahlung ein Laser verwendet wird.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Bestrahlung eine Hochintensitätsgasentladungslampe verwendet wird.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als photodynamische Verbindungen Verbindungen mit einem lipophilen Anteil verwendet werden.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen mit einer solchen Menge an photodynamischer Verbindung behandelt werden, dass nach Bestrahlung die Apoptose nach einem vorbestimmten Zeitraum eintritt.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen mit einer solchen Menge an photodynamischer Verbindung behandelt werden, dass nach Bestrahlung die Apoptose nach spätestens 5, bevorzugt spätestens 3 Tagen eintritt.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Bestimmung der Menge der photodynamischen Verbindung Zellen mit einer vorbestimmten Menge einer photodynamischen Verbindung in Kontakt gebracht und bestrahlt werden und anschließend die Bildung von NADH über einen Zeitraum verfolgt wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die quantitative Bestimmung von NADH mit zeitaufgelöster Fluoreszenzmesstechnik erfolgt.
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die quantitative Bestimmung der NADH-Konzentration über einen Zeitraum von 1 bis 100 Sekunden erfolgt.
16. Photodynamische Verbindung, die in einem Spektralbereich von 300 nm bis 3 μ m aktivierbar ist zur Behandlung von malignen Zellen ex vivo, um deren Zelltod zu induzieren.
17. Photodynamische Verbindung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung ausgewählt ist aus Porphyrinen, Phthalocyaninen, Hämatoporphyrin, Benzoporphyrin, Chlorinen, Aminolävulinsäure und Derivaten der vorgenannten Verbindungen.
18. Verwendung von photodynamischen Verbindungen nach Anspruch 16 oder Anspruch 17 zur Herstellung eines immunstimulierenden Präparates zur Behandlung von malignen Zuständen, insbesondere Krebs.

1/3

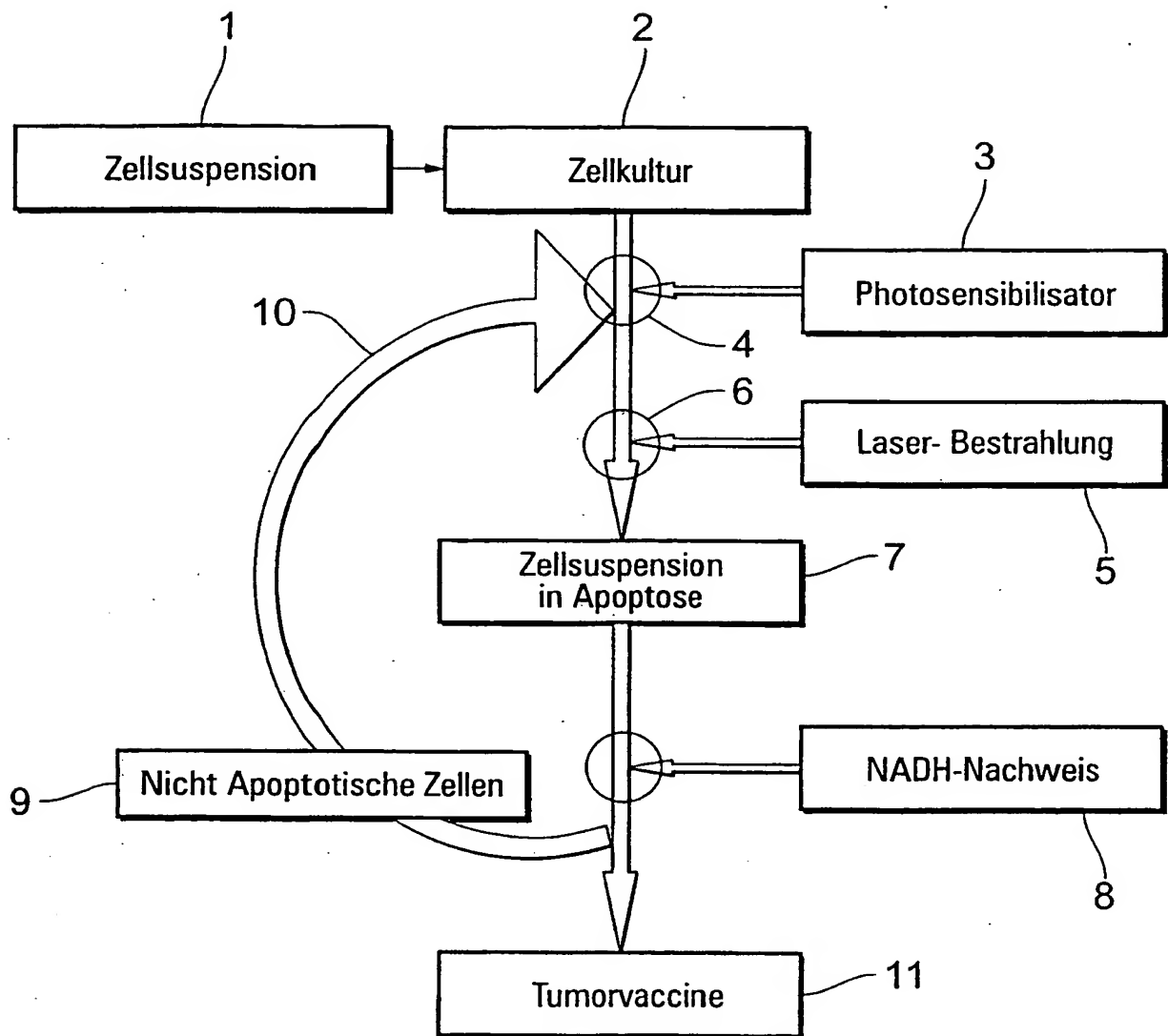


Fig. 1

2/3

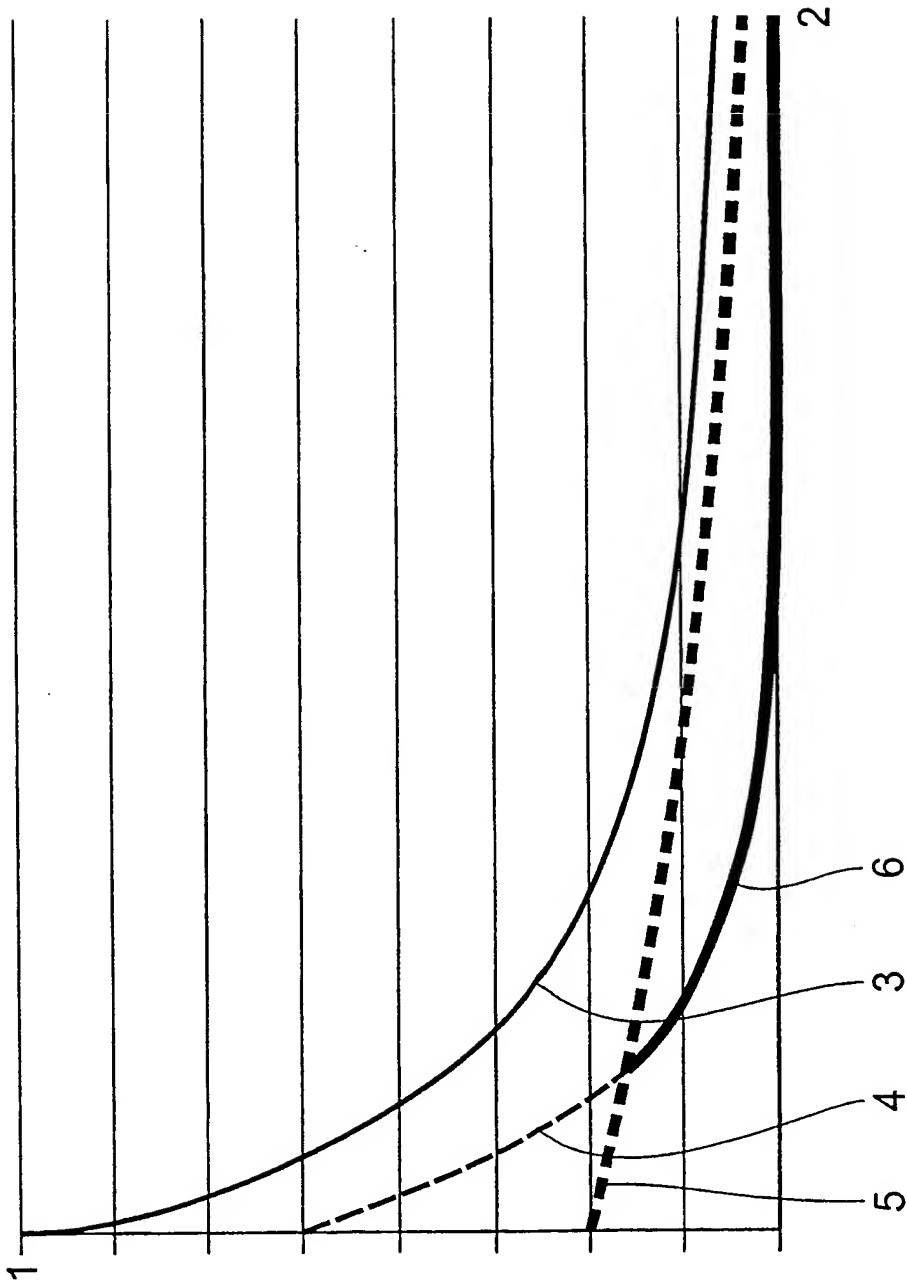


Fig. 2

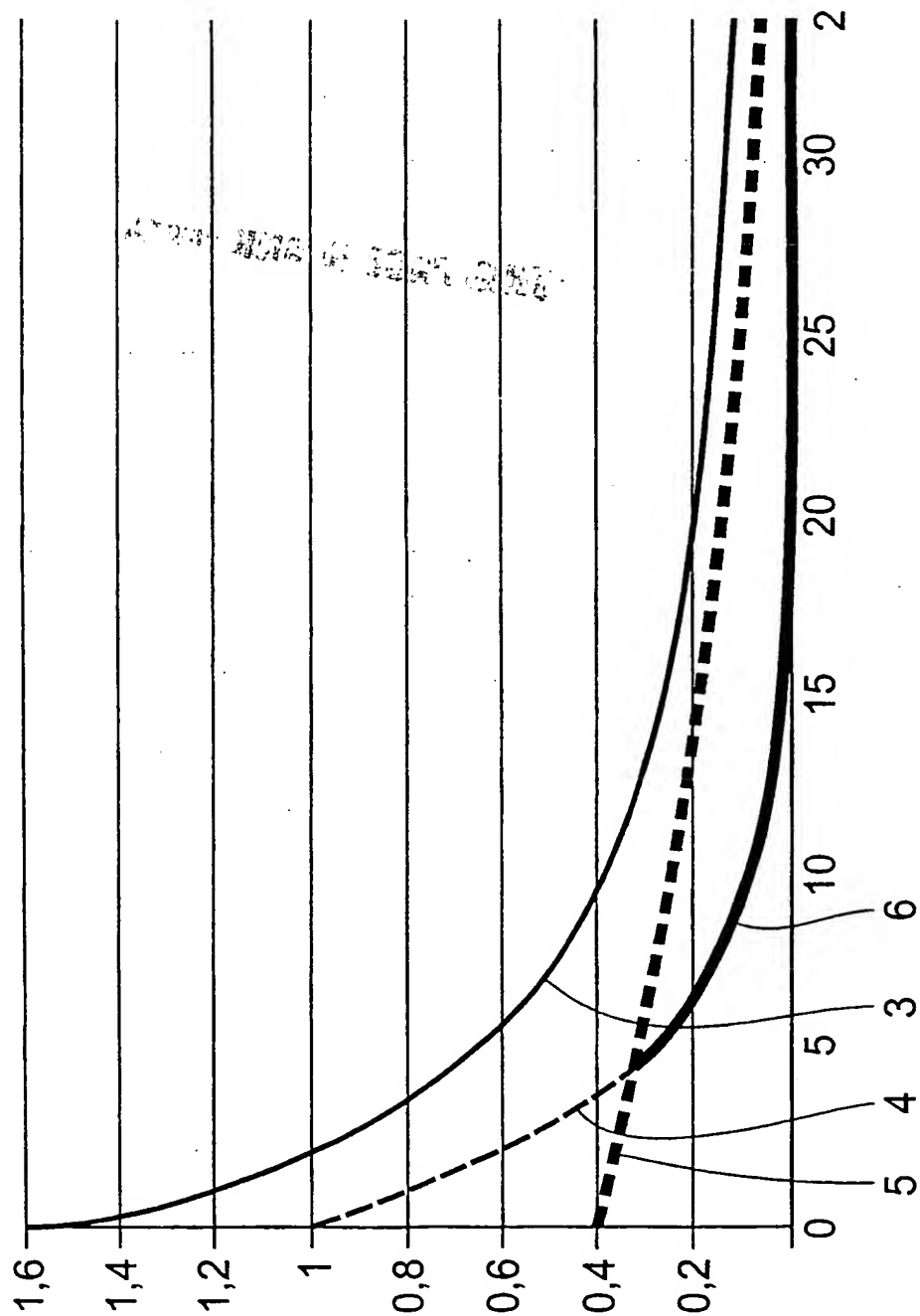


Fig. 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. Juni 2001 (21.06.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/43772 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 39/00,
41/00, C07D 487/22, C07C 229/22, A61P 35/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/04608

(22) Internationales Anmeldedatum:
18. Dezember 2000 (18.12.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 60 705.2 16. Dezember 1999 (16.12.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): LASER- UND MEDIZIN-TECHNOLOGIE
GMBH [DE/DE]; Fabeckstrasse 60-62, 14195 Berlin
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER, Gerhard
[DE/DE]; An der Rehwiese 8, 14129 Berlin (DE). KRA-
SICKA-ROHDE, Ewa [DE/DE]; Badensche Strasse 8,
10825 Berlin (DE). BINDIG, Uwe [DE/DE]; Berliner
Strasse 155/IV, 10825 Berlin (DE). BEUTHAN, Jür-
gen [DE/DE]; Calandrellistrasse 15, 12247 Berlin (DE).

DRESSLER, Cathrin [DE/DE]; Windscheidstrasse 22,
10627 Berlin (DE). MINET, Olaf [DE/DE]; Ufnaustrasse
3, 10553 Berlin (DE). PHILIPP, Carsten [DE/DE];
Wedellstrasse 11, 12247 Berlin (DE). BERLIEN,
Hans-Peter [DE/DE]; Warmbrunner Strasse 23a, 14193
Berlin (DE).

(74) Anwalt: EISENFÜHR, SPEISER & PARTNER; Pacel-
lallee 43/45, 14195 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 7. März 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR PRODUCING AN AUTOLOGOUS IMMUNIZATION VACCINE AGAINST CAN-
CEROUS DISEASES (TUMOUR VACCINE)

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR HERSTELLUNG EINES AUTOLOGEN IMMUNISIERUNGS-
IMPFSTOFFES GEGEN KREBSERKRANKUNGEN (TUMORVAKZINE)

(57) Abstract: The invention relates to a method and device enabling vital tumour cells taken from the bodies of humans or animals
to be modified in such a way that they can be re-introduced into the living organism in an inactivated state, stimulating the immune
system of said organism, by means of a polyvaccine.

(57) Zusammenfassung: Es soll ein Verfahren und eine Vorrichtung entwickelt werden, mittels derer es gelingt vitale, aus dem
Körper des Menschen oder des Tieres gewonnene Tumorzellen derart zu modifizieren, dass sie, inaktiviert, jedoch das Immunsys-
tem des Lebewesens stimulierend, im Rahmen einer einfachen oder Mehrfach-Impfung dem lebenden Organismus wieder zugeführt
werden können.

WO 01/43772 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/04608

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/00 A61K41/00 C07D487/22 C07C229/22 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, CANCERLIT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | US 5 571 082 A (BASHIKIROV ALEXEI B) 5 November 1996 (1996-11-05) | 1-4, 8, 10, 16-18 |
| Y | the whole document | 5, 17 |
| Y | US 5 736 563 A (RICHTER ANNA M) 7 April 1998 (1998-04-07) column 2, line 22 - line 36 column 3, line 42 - column 4, line 8 claims 1-8 | 5, 17 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 August 2001

Date of mailing of the international search report

07/08/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stein, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/04608

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-------------------------|
| X | WO 99 38380 A (UNIV YALE ;EDELSON RICHARD LESLIE (US)) 5 August 1999 (1999-08-05) page 3, line 13 -page 4, line 23 page 7, line 14 -page 8, line 25 page 9, line 4 - line 11 page 10, line 9 -page 11, line 17 page 12, line 18 - line 23 claims 1-15,17-19 ----- | 1,2, 10-12, 16,18 |
| A | WO 97 34472 A (UNIV YALE ;EDELSON RICHARD LESLIE (US)) 25 September 1997 (1997-09-25) page 8, line 28 -page 14, line 4 page 27, line 4 - line 10 claims 1-9 ----- | 1-12 |
| A | BEUTHAN J ET AL: "OBSERVATIONS OF THE FLUORESCENCE RESPONSE OF THE COENZYME NADH IN BIOLOGICAL SAMPLES" OPTICS LETTERS,US,OPTICAL SOCIETY OF AMERICA, WASHINGTON, vol. 18, no. 13, 1 July 1993 (1993-07-01), pages 1098-1100, XP000372748 ISSN: 0146-9592 the whole document ----- | 13-15 |

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1, 2, 6-16, 18 (all partly)

Patent claims 1, 2, 6-16, 18 relate to compounds that are characterized by their photodynamic properties in the 300 nm-300 um spectral region. However, said patent claims do not contain any structural or essential characteristics of said compounds. For this reason, the patent claims comprise all compounds having said property, whereas the patent application only supports a limited number of said compounds through the description in accordance with PCT Article 5. In the present case, the patent claims lack the necessary support or the patent application lacks the necessary disclosure to such an extent that a meaningful search covering the entire scope of protection being sought for appears to be impossible. Notwithstanding, the patent claims also lack the necessary clarity defined in PCT Article 6, whereby it is sought to define the compound by means of the desired result. Said lack of clarity is such that a meaningful search covering the entire scope of protection being sought for appears to be impossible. For this reason, the search was directed towards those parts of the patent claims that appeared to be clear, supported or disclosed as previously defined, namely those parts referring to the compounds described in the description in page 5, lines 1-13 and in patent claims 3-5 and 17.

The applicant's attention is drawn to the fact that patent claims, or parts of patent claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective whether or not the patent claims are amended following receipt of the International Search Report (PCT Art. 19) or whether or not the applicant files new patent claims during any PCT Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/04608

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 5571082 | A | 05-11-1996 | RU 2118177 C | 27-08-1998 |
| US 5736563 | A | 07-04-1998 | US 5484803 A | 16-01-1996 |
| | | | AT 201596 T | 15-06-2001 |
| | | | AU 681088 B | 21-08-1997 |
| | | | AU 4940593 A | 12-04-1994 |
| | | | CA 2144327 A | 31-03-1994 |
| | | | WO 9406424 A | 31-03-1994 |
| | | | DE 69330277 D | 05-07-2001 |
| | | | EP 0660712 A | 05-07-1995 |
| | | | FI 951295 A | 17-05-1995 |
| | | | HU 70966 A | 28-11-1995 |
| | | | IL 107035 A | 27-12-1998 |
| | | | JP 8501301 T | 13-02-1996 |
| | | | NO 951066 A | 19-05-1995 |
| | | | PL 308116 A | 24-07-1995 |
| | | | SK 35295 A | 08-05-1996 |
| | | | ZA 9306968 A | 12-04-1994 |
| WO 9938380 | A | 05-08-1999 | AU 2475099 A | 16-08-1999 |
| | | | EP 1054591 A | 29-11-2000 |
| WO 9734472 | A | 25-09-1997 | AU 2331597 A | 10-10-1997 |
| | | | CA 2249412 A | 25-09-1997 |
| | | | EP 0896506 A | 17-02-1999 |
| | | | JP 2000508628 T | 11-07-2000 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/04608

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K39/00 A61K41/00 C07D487/22 C07C229/22 A61P35/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, CANCERLIT

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. (|
|------------|---|----------------------|
| X | US 5 571 082 A (BASHIKIROV ALEXEI B) 5. November 1996 (1996-11-05) | 1-4,8, 10,16-18 |
| Y | das ganze Dokument | 5,17 |
| Y | US 5 736 563 A (RICHTER ANNA M) 7. April 1998 (1998-04-07) Spalte 2, Zeile 22 - Zeile 36 Spalte 3, Zeile 42 - Spalte 4, Zeile 8 Ansprüche 1-8 | 5,17 |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. August 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

07/08/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stein, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/04608

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|------------------------------------|
| X | <p>WO 99 38380 A (UNIV YALE ;EDELSON RICHARD LESLIE (US)) 5. August 1999 (1999-08-05)</p> <p>Seite 3, Zeile 13 -Seite 4, Zeile 23 Seite 7, Zeile 14 -Seite 8, Zeile 25 Seite 9, Zeile 4 - Zeile 11 Seite 10, Zeile 9 -Seite 11, Zeile 17 Seite 12, Zeile 18 - Zeile 23 Ansprüche 1-15,17-19</p> <p>---</p> | <p>1,2, 10-12, 16,18</p> |
| A | <p>WO 97 34472 A (UNIV YALE ;EDELSON RICHARD LESLIE (US)) 25. September 1997 (1997-09-25) Seite 8, Zeile 28 -Seite 14, Zeile 4 Seite 27, Zeile 4 - Zeile 10 Ansprüche 1-9</p> <p>---</p> | <p>1-12</p> |
| A | <p>BEUTHAN J ET AL: "OBSERVATIONS OF THE FLUORESCENCE RESPONSE OF THE COENZYME NADH IN BIOLOGICAL SAMPLES" OPTICS LETTERS,US,OPTICAL SOCIETY OF AMERICA, WASHINGTON, Bd. 18, Nr. 13, 1. Juli 1993 (1993-07-01), Seiten 1098-1100, XP000372748 ISSN: 0146-9592 das ganze Dokument</p> <p>-----</p> | <p>13-15</p> |

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1,2,6-16,18 (alle teilweise)

Die geltenden Patentansprüche 1,2,6-16 und 18 beziehen sich auf Verbindungen, charakterisiert durch ihre photodynamische Eigenschaft im Spektralbereich von 300 nm - 300 nm. Diese Patentansprüche enthalten jedoch keine strukturellen oder essentiellen Charakteristika dieser Verbindungen.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Verbindungen die diese Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Verbindungen liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, die Verbindung über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend die Verbindungen beschrieben in der Beschreibung auf Seite 5 ZZ 1-13 und in den Patentansprüchen 3-5 und 17.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/04608

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | | Datum der Veröffentlichung |
|--|---|-------------------------------|-----------------------------------|--------------|-------------------------------|
| US 5571082 | A | 05-11-1996 | RU | 2118177 C | 27-08-1998 |
| US 5736563 | A | 07-04-1998 | US | 5484803 A | 16-01-1996 |
| | | | AT | 201596 T | 15-06-2001 |
| | | | AU | 681088 B | 21-08-1997 |
| | | | AU | 4940593 A | 12-04-1994 |
| | | | CA | 2144327 A | 31-03-1994 |
| | | | WO | 9406424 A | 31-03-1994 |
| | | | DE | 69330277 D | 05-07-2001 |
| | | | EP | 0660712 A | 05-07-1995 |
| | | | FI | 951295 A | 17-05-1995 |
| | | | HU | 70966 A | 28-11-1995 |
| | | | IL | 107035 A | 27-12-1998 |
| | | | JP | 8501301 T | 13-02-1996 |
| | | | NO | 951066 A | 19-05-1995 |
| | | | PL | 308116 A | 24-07-1995 |
| | | | SK | 35295 A | 08-05-1996 |
| | | | ZA | 9306968 A | 12-04-1994 |
| WO 9938380 | A | 05-08-1999 | AU | 2475099 A | 16-08-1999 |
| | | | EP | 1054591 A | 29-11-2000 |
| WO 9734472 | A | 25-09-1997 | AU | 2331597 A | 10-10-1997 |
| | | | CA | 2249412 A | 25-09-1997 |
| | | | EP | 0896506 A | 17-02-1999 |
| | | | JP | 2000508628 T | 11-07-2000 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)